

Composition of polyunsaturated fatty acids based on eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids

Publication number: IT1235879

Publication date: 1992-11-23

Inventor: BREIVIK HARALD; BORRETZEN BERNT; DAHL KNUT
HELKAS; KROKAN HANS EINAR; BONAA KAARE H
Applicant: NORSK HYDRO AS (NO)

Classification:

- **International:** *A61K31/20; A61K31/202; A61K31/23; A61K35/60;
A61K38/00; A61P1/04; A61P3/06; A61P9/00;
A61P9/08; A61P9/12; A61P17/00; A61P25/04;
A61P29/00; C07C57/03; C11C1/00; A61K31/185;
A61K31/21; A61K35/56; A61K38/00; A61P1/00;
A61P3/00; A61P9/00; A61P17/00; A61P25/00;
A61P29/00; C07C57/00; C11C1/00; (IPC1-7): A61K*

- **European:** A61K31/20; A61K31/202; C07C57/03

Application number: IT19890021521 19890811

Priority number(s): GB19880019110 19880811

Also published as:

 NL8902020 (A)
 LU87570 (A)
 JP2104522 (A)
 GR89100507 (A)
 GB2221843 (A)

[more >>](#)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for IT1235879

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

UK Patent Application (19) **GB** (11) **2 221 843 A** (13)
(43) Date of A publication 21.02.1990

(21) Application No 8917711.7

(22) Date of filing 02.08.1989

(30) Priority data (31) 8819110 (32) 11.08.1988 (33) GB

(71) Applicant

Norsk Hydro a s

(Incorporated In Norway)

Bygdey Allé 2, 0257 Oslo 2, Norway

(72) Inventors

Hans Einar Krokan

Kasre H. Benaa

Harald Breivik

Bernt Barretzen

Knut Helgas Dahl

(74) Agent and/or Address for Service

Lloyd Wlae Tregear & Co

**Norman House, 105-109 Strand, London, WC2R 0AE,
United Kingdom**

(51) INT CL⁴

A61K 31/20

(52) UK CL (Edition J)

**A5B BJA B180 B26Y B401 B406
U1S S2415**

(56) Documents cited

**GB 2197199 A GB 2148713 A EP 0283140 A2
EP 0175468 A2 WO 87/02247 A1
Acta. Toxicol. Ther., Vol.8 (3), Pages 339-352**

(58) Field of search

**UK CL (Edition J) A5B BHA BJA BJB BJC
INT CL⁴ A61K
Online Databases: CAS online, WPI**

(54) **Omega-3-fatty acid composition**

(57) Fatty acid composition comprising at least 80% by weight of omega-3-fatty acids, salts or derivatives thereof, wherein (all-Z)-5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid (EPA) and (all-Z)-4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoic acid (DHA) comprise at least 75% by weight of the total fatty acids and are in a ratio of 1:2 to 2:1. The compositions can be used for the treatment or prophylaxis of multiple risk factors for cardiovascular diseases.

GB 2 221 843 A

FATTY ACID COMPOSITION

Present invention relates to a fatty acid composition comprising at least 80% by weight of omega-3 polyunsaturated fatty acids, wherein at least 75% by weight of the total fatty acids comprise omega-3 (all-Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid (EPA) C 20:5 and (all-Z)-4,7,10,13,16,29-docosahexaenoic acid (DHA) C 22:6.

Field of Invention

Cardiovascular diseases leading to morbidity and premature mortality is related to several risk factors such as hypertension, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, high blood platelet aggregation and according to recent findings, a high activity of the blood coagulation factor VII phospholipid complex. Over the last three decades antihypertensive drugs have contributed to the decline in cardiovascular disease-related morbidity and mortality. There is however heightened concern about side effects and toxicity associated with the current antihypertensive therapy, especially in the mild hypertensive patient. There are results indicating that although the presently used antihypertensive agents are efficient in reducing blood pressure the pulse rate is coincidentally enlarged. Thus there is a need for a drug with fewer adverse effects for the treatment of hypertension. It would be particularly advantageous if such a drug could be used for the simultaneous treatment of all the above mentioned mul-

tiple risk factors associated with cardiovascular diseases, which is generally not the case with the currently available antihypertensive drugs.

Description of prior art

During the last decade numerous publications have appeared which report that various dietary fish oil preparations containing omega-3 polyunsaturated fatty acids have an effect on serum cholesterol and blood platelet aggregation. The mechanisms suggested for these effects often centre around the prostanoid system. Thus there is some information on how dietary fish oils alter the excretion of some prostaglandin metabolites but available data conflict on several points.

A reduction of blood pressure has been reported after intake of fish, crude fish oil (starting at 7% EPA and 5% DHA) or slightly concentrated fish oil preparations (typically containing 18% EPA and 12% DHA) although the components responsible for these effects were never identified. Furthermore all the studies presented so far had one or more serious flaws as pointed out in reviews of the available studies [H.R.Knapp et al., Proceedings of AOCS Short Course on polyunsaturated Fatty Acids and Eicosanoids, Ed. W.E.M. Lands, pp.41-55, American Oil Chemists Society] and [K. Bønnaa, Tidsskr. Nor Lægeforen nr. 28, 1987, 2425-8].

Eicosapentaenoic acid C 20:5 omega 3 (EPA) has been considered to be the most important of the marine omega-3 polyunsaturated fatty acids partly because of its potent antiaggregatory action i.a. reported in US Patent No. 4,097,602, Silver et al, which was filed in August 1974. Later Dyerberg et al also described the same effect in [Lancet, p.152, Jan.21, 1978] and [Lancet II, p 117-119, July 15, 1978]. The main reason for the assumed importance of EPA is probably that it belongs to the eicosanoids which are key substances for the prostaglandin metabolism.

However according to several recent reports EPA alone does not have a significant effect on hypertension. In "Effects of highly purified eicosapentaenoic acid to angiotensin II and norepinephrine in the rabbit", [Prostaglandins August 1986, Vol. 32, No 2, pp 179-187] no reduction to blood pressure in rabbits was obtained using highly purified EPA of 90% concentration. Terano et al, [Atherosclerosis, 46, 321-331, (1983)] reported that a preparation containing 75% EPA and 6.2% DHA had no significant effect on blood pressure in healthy volunteers after an intake of 3.6 g EPA ethyl ester. Similarly, Yoshida et al, [Artery, 14, 295-303, 1987], reported no effect on basal blood pressure after intake of 900mg EPA ethyl ester for 14 days or more. Furthermore 90% EPA methyl ester had no effect on spontaneously hypertensive rats [K. Yin et al, 1988, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 15, 275-280].

In contrast to this, British patent application 2197199 describes a composition for combatting pregnancy-induced hypertension where the compositions used in the example had an EPA content of 28-35%. The patients had no earlier history of hypertension. Hypertension being developed under pregnancy is considered to have different biological causes than normal hypertension, which seems to be underlined by the fact that it usually disappears after the termination of the pregnancy.

To our knowledge there is nothing to suggest that DHA alone has any effect on the blood pressure.

According to US patent 3,082,228 based on an application filed Dec.18, 1959 a product containing at least 60% polyunsaturated fatty acids having 20 C atoms or more lowers the blood cholesterol content significantly. Although other early studies indicate that fish oils lower total cholesterol and LDL-cholesterol and raises HDL-cholesterol later results have generally drawn the opposite conclusion as pointed out by W.S.Harris in [(n-3)news, 3 (4), 1-7]. Thus when summarizing 45 articles on

the subject, he found that LDL-cholesterol was increased by 2-30% depending on the type of hyperlipidaemia.

From PCT/NO 87/02247 is known a lipid emulsion for parenteral use comprising an emulsifier, water and a marine oil comprising at least one omega-3 fatty acid wherein the concentration of the free fatty acid in the emulsion is below about 5 meq/l, and wherein the marine oil will contain at least 30% by weight of a combination of esters of EPA and DHA. This lipid emulsion is used for the intravenous treatment of thrombotic disease states.

Summary of the invention

It has now been found that fatty acid compositions containing a high concentration, of at least 80 % by weight, of omega-3 fatty acids, salts or derivatives thereof, where EPA and DHA are present in relative amounts of 1:2 to 2:1, and constitute at least 75% of the total fatty acids, has a surprisingly advantageous effect on all the above mentioned risk factors for cardiovascular diseases, but especially a good effect on mild hypertension, hypertriglyceridemia and on the coagulation factor VII phospholipid complex activity. It lowers serum LDL-cholesterol, increases serum HDL-cholesterol, lowers serum triglycerides, lowers systolic and diastolic blood pressure and the pulse rate and lowers the activity of the blood coagulation factor VII-phospholipid complex. Although the detailed biological mechanisms for the effects of the compositions according to present application are not explicitly known, there are indications of a surprising synergism between the action of EPA and of DHA.

One advantage of the compositions according to present application is their being very well tolerated, not giving rise to any severe side effects.

An especially preferred composition according to present

application comprises at least 90% by weight of long chain, polyunsaturated omega-3 fatty acids of which EPA and DHA constitute at least 85% by weight of the total fatty acids and are present in a ratio of EPA:DHA from 1:1 to 2:1 especially about 3:2.

In order to isolate EPA and DHA in a mixture of high concentration according to present application, a special method was developed for purifying and isolating the long chain fatty acids from natural fish oils. Compositions according to present application may be produced according to the method of our European Patent Application No.86906964.1. The analysis in % by weight was based on the ethyl esters even if other derivatives or salts or the acids themselves are a part of the present invention.

Detailed Description of the Invention

The composition according to this invention is preferably produced via the following method. Initially the marine oil raw material is esterified and concentrated via urea fractionation or the like, where the conditions are sufficiently mild to avoid disintegration of the products. The second stage is a molecular distillation.

The fractionation in principle initially removes the major part of the esters having chain length below C 20. Thereafter a main fraction is removed consisting essentially of esters of the C 20- and C 22 acids. As the urea fractionation removes the saturated and less unsaturated esters, this fraction will contain high concentrations of EPA and DHA, according to the present method at least 75% by weight. The total amount of the long chain omega-3 acids will be at least 80% by weight. Other preferred compositions according to present application contain at least 95% by weight, with the EPA plus DHA content being at least 90% by weight. Another preferred composition according to present application contains at least 85% by

weight of the total omega-3 fatty acids and an EPA and DHA amount of at least 80% by weight.

Other omega-3 acids of the C 20, C 21 and C 22 series will be obtained approximately in their original concentrations, e.g. from 3-5% by weight, typically at least 4.5% by weight. Thus the special and odd-numbered omega-3 all-Z 6, 9, 12, 15, 19 - heneicosapentaenoic acid C 21:5 is normally present in concentrations of at least 1.5% by weight and omega-3 all-Z 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid normally in concentrations of about 3.0% by weight.

After removing the urea precipitate, the solvent used, normally ethanol, is partially or fully removed by evaporation and the esters thus isolated may be further purified by washing with water or a slightly alkaline water solution if the pure esters without contamination of the acids should be isolated.

The free acids may be produced by well known hydrolyzation procedures.

The upgrading of the EPA fraction to obtain a weight ratio of EPA:DHA of from 1:1 to 2:1, especially 3:2 or the upgrading of the DHA fraction to obtain a EPA:DHA weight ratio of from 1:1 to 1:2 may be achieved in the molecular distillation stage. The method also provides the possibility of using supercritical fluid extraction and/or chromatography in the second stage with CO₂ eventually containing a more polar modifier, such as ethanol, in order to concentrate the EPA and/or DHA fraction.

The urea fractionation and the subsequent molecular distillation are performed under gentle conditions to avoid oxidation and/or isomerisation of the highly unstable omega-3 acids. As seen from Table 1 and 2 below, which gives the analysis of products obtained in accordance with the method of this invention, there was not more than 1% of unknown components

in the purified product. There are, however, a certain amount of minor products such as C-16 and C-18 acids as will appear from the detailed analysis shown in Table 2.

For the main part these products will be the combined sum of the fraction of fatty acid esters, which are naturally occurring in fish oils, but the concentration of each separate ester in the finished product is less than 0.2%, apart from the omega-3 octadecatetraenoic acid C 18:4 n-3, which is present in approximately the same amount as in the starting material.

Thus it will be understood that the total concentration of by-products occurring from the process is very low.

The process is flexible enough to affect the relative proportions between the long chain C 20, C 21 and C 22 fatty acids which occur naturally in available fish oil raw materials. It provides not only for the upgrading of the individual acids, but the ratio between them will remain within a pattern of variation which is optimal in nature. But simultaneously there is room for compensating the sometimes extreme variations which may occur naturally, cfr. below. Thus it will be possible to make a product with a constant and predetermined composition.

Fish oils may also contain by-products and contaminants such as pesticides, chlorinated hydrocarbons, heavy metals, cholesterol and vitamins. During the production of the concentrate, the concentrations of these components are significantly reduced compared to untreated fish oils.

In nature the relative contents of EPA and DHA, and also of the other long chain omega-3 acids, is dependent on the marine species and there are also seasonal variations within the same species. In the USA fish oil is today mainly produced from menhaden. This oil will typically contain 14-19% EPA and 5-8% DHA. Our analysis of one cod liver oil batch showed a content

of 6.9 EPA and 8.4 DHA. For capelin the EPA values varied from 8.6 to 11.4 from January 1973 to August 1973, while the DHA values from 6.7% to 11% during the same period. For Norwegian coastal herring the content in October 1973 was 6.4% EPA and 9.8% DHA, while catches in November 1983 showed a reduction to 1.7% and 1.1%, respectively.

These variations mean that dietary intake of fish oils or fish alone, will not secure a constant supply of omega-3 acids. Even if all the long chain C 20, C 21 and C 22 omega-3 acids will not or only may become moderately upgraded during the process, they will be preserved at least in their original proportions.

In Table 1 the left hand column illustrates the typical variations between the contents of individual long chain acids in the compositions of this invention, while the right hand column shows the exact analysis of the test sample used in the study on the biological effects, the results of which are shown in the Tables 4-8 below.

Table 1

| | Typical product variation | Test Sample |
|----------------|---------------------------|-------------|
| C 20:4 omega-6 | 1- 2 | 1,4 |
| C 20:5 omega-3 | 40-60 wt % | 54 wt % |
| C 21:5 omega-3 | 1- 4 " | 1,5 " |
| C 22:5 omega-3 | 1- 3 " | 2 " |
| C 22:6 omega-3 | 25-45 " | 32,6 " |
| lower acids | 3- 8,5 " | 7,5 " |
| unknown | 1 " | 1 " |
| sum Omega-3 FA | | 90.1 " |
| sum EPA + DHA | | 86.6 " |
| EPA : DHA | | 3.3 : 2 |

Table 2 shows a detailed analysis of a batch of starting material and of another composition of this invention obtained therefrom.

Table 2

| <u>Fatty acid composition (%)</u> | | |
|-----------------------------------|--|--|
| <u>Fatty acid</u> | <u>Starting material Fish oil,</u> | <u>Product ethyl ester test sample</u> |
| C14:0 | 7.6 | 0.0 |
| Pristanate | 0.4 | 0.0 |
| C16:0 | 19.1 | 0.0 |
| C16:1 n7 | 7.2 | 0.0 |
| 7-Me16:0 | 0.3 | 0.0 |
| C16:2 n6 | 0.5 | 0.0 |
| C16:2 n4 | 1.2 | 0.0 |
| Phytanate | 0.3 | 0.0 |
| C16:3 n4 | 0.5 | 0.0 |
| C16:4 n1 | 1.0 | 0.2 |
| C18:0 | 2.3 | 0.0 |
| C18:1 n9 | 9.1 | 0.0 |
| C18:1 n7 | 3.0 | 0.0 |
| C18:1 n5 | 0.4 | 0.1 |
| C18:2 n6 | 1.1 | 0.0 |
| C18:2 n4 | 0.2 | 0.0 |
| C18:3 n6 | 0.2 | 0.2 |
| C18:3 n3 | 0.7 | 0.2 |
| C18:4 n3 | 2.5 | 2.8 |
| C18:4 n1 | 0.1 | 0.2 |
| C20:1 n9+7 | 5.9 | 0.0 |
| C20:1 | 0.1 | 0.0 |
| C20:2 n6 | 0.2 | 0.1 |
| C20:3 n6 | 0.1 | 0.0 |
| C20:4 n6 | 0.7 | 1.4 |
| C20:4 n3 | 1.2 | 0.9 |
| C20:5 n3 | 16.5 | 53.4 |
| C22:1 n11+9 | 4.6 | 0.0 |
| C22:2 n6 | 0.7 | 0.0 |
| C21:5 n3 | 0.9 | 1.6 |
| C22:4 n6 | 0.1 | 0.0 |
| C22:5 n6 | 0.1 | 0.4 |
| C22:5 n3 | 2.0 | 3.1 |
| C22:6 n3 | 7.9 | 34.3 |
| Sum unknown | 1.0 | 1.0 |
| Sum omega-3 FA | 31.7 | 95.4 |
| incl. C 18 | 3.2 | 3.0 |
| Sum EPA +DHA | 24.4 | 87.7 |
| EPA : DHA | 2.1 : 1 | 3.1 : 2 |

Table 3 shows the main fatty acid contents of several compositions according to present application.

Table 3

| Fatty acid | Composition (%) | | | | | |
|---------------------|-----------------|-------|-------|-------|------|-------|
| C18:2 n6 | 0.3 | 0.3 | 0.1 | 0.0 | 0.2 | 0.1 |
| C18:3 n3 | 0.3 | 0.3 | 0.0 | 0.1 | 0.3 | 0.0 |
| C18:4 n3 | 2.3 | 2.3 | 3.6 | 2.2 | 1.8 | 0.7 |
| C18:4 n1 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.3 | 0.0 | 0.0 |
| C20:4 n6 | 1.7 | 1.7 | 1.5 | 3.9 | 1.6 | 1.6 |
| C20:4 n3 | 2.4 | 0.9 | 1.3 | 1.2 | 1.9 | 0.3 |
| C20:5 n3 | 54.7 | 52.7 | 42.2 | 48.5 | 41.0 | 31.7 |
| C21:5 n3 | 2.1 | 2.1 | 1.7 | 2.0 | 1.7 | 1.2 |
| C22:5 n6 | 0.4 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 0.7 | 1.1 |
| C22:5 n3 | 5.4 | 5.8 | 2.8 | 4.3 | 5.8 | 3.3 |
| C22:6 n3 | 28.7 | 31.0 | 38.0 | 34.9 | 42.4 | 58.5 |
| Sum n3FA incl. C 18 | 95.9 | 95.1 | 89.6 | 93.2 | 94.9 | 95.7 |
| Sum EPA+DHA | 83.4 | 83.7 | 80.2 | 83.4 | 83.4 | 90.2 |
| EPA : DHA | 1.9:1 | 1.7:1 | 1.1:1 | 1.4:1 | 1:1 | 1:1.8 |

n3FA denotes omega-3 fatty acids

BIOLOGICAL EFFECTS.

In order to evaluate the effect of a composition according to present application on blood pressure, pulse rate, triglyceride levels, serum cholesterol and HDL-cholesterol, blood platelet aggregation and the coagulation factor VII phospholipid complex activity, the whole population aged 34-60 years, of a small Norwegian town was invited to a health check and of those, 22000 persons were screened for the following criteria:

- untreated moderate hypertension of a diastolic blood pressure (DBP) ranging from 89 to 111 mm Hg and a systolic blood pressure (SBP) from 110 to 180 mm Hg.
- no previous cardiac illness and not using cardiac drugs
- no severe diseases
- not extremely overweight

- no alcoholism
- serum cholesterol of at least 6.0 mmol/liter

The group of volunteers selected by these criteria amounted to 172 persons. The volunteers were screened during a run-in period of 6 month to ensure stabilization of blood pressure before the test substance was administered.

All blood pressure measurements were done with an automatic instrument (Dinamap) and at each occasion three measurements (with 2 minutes intervals) were done sitting and standing under controlled conditions. The average of the two last sitting and standing measurements were used.

The study was a controlled double blind one. The 172 volunteers were randomized to two groups of similar size. One group was treated with placebo capsules of corn oil, each with 1 g corn oil added 0.3% Vitamin E. The other group received capsules containing 1 g of the test substance whose composition is given in Table 1. Both sets of capsules were made of coloured soft gelatin to assure the blind effect. The volunteers were asked to take 3 capsules twice daily of either the test or control substance for 11 to 12 weeks. 171 volunteers completed the study and on average about 90% of the capsules were taken.

As will appear from tables 4 and 5 below, corn oil had no statistically significance effect on the blood pressure. The effect on the test substance on blood pressure was assessed first on the whole group taking the test substance and next on those individuals with higher blood pressures. The average blood pressures for the patients with higher blood pressures at the start and finish of the treatment with the active test substance of this invention are given in Table 4 (diastolic blood pressure) and Table 5 (systolic blood pressure).

Table 4EFFECT OF TEST SUBSTANCE AND CORN OIL
ON DIASTOLIC BLOOD PRESSURE

| DBP Range | Number of patients | Average DBP before treatment (mm Hg) | Average DBP after treatment (mm Hg) | Average Reduction in DBP (mm Hg) | Significance |
|-----------------------|--------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|--------------|
| <u>Test substance</u> | | | | | |
| 85-109 | 62 | 95.8 | 93.4 | 2.4 | p<0.05 |
| 98-109 | 22 | 102 | 96.2 | 5.8 | p<0.01 |
| <u>Corn oil</u> | | | | | |
| 85-109 | 57 | 95.7 | 96.0 | 0 | n.s. |
| 98-109 | 26 | 101.8 | 100.7 | 1.1 | n.s. |

n.s. means not significant

Table 5EFFECT OF TEST SUBSTANCE AND CORN OIL
ON SYSTOLIC BLOOD PRESSURE

| SBP of patients (mm Hg) | Number of patients | Average SBP before treatment (mm Hg) | Average SBP after treatment (mm Hg) | Average Reduction in SBP (mm Hg) | Significance |
|-------------------------|--------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|--------------|
| <u>Test substance</u> | | | | | |
| > 135 | 71 | 148.1 | 144.5 | 3.6 | p<0.05 |
| > 150 | 24 | 158.4 | 150.3 | 8.1 | p<0.001 |
| > 155 | 15 | 162.2 | 152.4 | 9.8 | p<0.001 |
| <u>Corn oil</u> | | | | | |
| > 135 | 62 | 148.5 | 149.6 | 0 | n.s. |
| > 150 | 23 | 159.1 | 158.0 | 1.1 | n.s. |
| > 155 | 17 | 161.8 | 159.6 | 2.2 | n.s. |

As is evident from the above tables, the test substance had a highly significant hypotensive effect both on systolic and diastolic blood pressure. It is also clear that the effect is

strongest on those patients with the highest blood pressure.
No significant effect was obtained in the corn oil group.

Table 6

EFFECT OF TEST SUBSTANCE AND CORN OIL
ON SYSTOLIC AND DIASTOLIC BLOOD PRESSURE
ACCORDING TO DIETARY INTAKE OF FISH (DISHES PER WEEK)

| Dishes per week | Number of patients | | Average BP before treatment (mm Hg) | Average BP after treatment (mm Hg) | Average Reduction in BP (mm Hg) | Signifi- cance |
|--------------------|--------------------------|-----|--|---|--|-------------------|
| <hr/> | | | | | | |
| Test substance | | | | | | |
| 0-2 | 44 | SBP | 145.3 | 139.3 | -6.9 | p=0.005 |
| | | DBP | 99.8 | 94.0 | -5.7 | p=0.0001 |
| 3-5 | 34 | SBP | 143.6 | 141.2 | -2.4 | p=0.2 |
| | | DBP | 97.7 | 96.3 | -1.4 | p=0.2 |
| <hr/> | | | | | | |
| Corn oil | | | | | | |
| 0-2 | 34 | SBP | 145.2 | 146.8 | +1.6 | p=0.4 |
| | | DBP | 98.3 | 100.2 | +1.9 | p=0.1 |
| 3-5 | 44 | SBP | 142.3 | 143.4 | +1.1 | p=0.5 |
| | | DBP | 97.4 | 97.9 | +0.5 | p=0.7 |

As appears from Table 6 a good hypotensive effect is achieved with the composition according to present application, surprisingly so even in the group with a high dietary intake of fish of 3-5 dishes per week. In comparison, no beneficiary effect is achieved with corn oil.

The results shown above indicates that a composition according to present application gives a surprisingly much better effect than a dietary intake of fish or slightly concentrated maine oil would lead to expect. This is probably due to a synergistic effect of EPA and DHA.

Compared with the test results achieved in the previously conducted studies with a dietary intake of marine fish oils,

the results achieved with a composition according to present application show a surprising improvement in effect on diastolic and systolic bloodpressure of slightly hypertensive patient respectively the more hypertensive patient of approximately 30% and 45%.

Table 7

EFFECT OF TEST SUBSTANCE AND CORN OIL
ON PULSE RATE (per minute)

| Group | Before | After | Change | Significance |
|------------|--------|-------|--------|--------------|
| Test subst | | | | |
| sitting | 75.4 | 73.2 | -2.2 | p<0.02 |
| standing | 82.9 | 80.2 | -2.7 | p<0.005 |
| Corn Oil | | | | |
| sitting | 74.3 | 75.1 | +0.8 | p=0.3 |
| standing | 80.9 | 82.2 | +1.3 | p=0.2 |

The pulse rate study included 78 persons in the group receiving the test substance and 77 persons in the other group.

As will appear from the Table above there was obtained a significant lowering in pulse rate with the test substance according to present application and a slight not significant raise of pulse rate with corn oil.

Table 8

EFFECT OF TEST SUBSTANCE AND CORN OIL
ON SERUM CHOLESTEROL [mmol/liter]

| GROUP | BEFORE | | AFTER | |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Tot.chol. | HDL Chol. | Tot.Chol. | HDL Chol. |
| <u>All Patients:</u> | | | | |
| Test substance (n=78) | 6.58 | 1.35 | 6.57 | 1.41** |
| Corn oil (n=78) | 6.68 | 1.33 | 6.64 | 1.41** |
| <u>Tot. Chol.>7</u> | | | | |
| Test substance (n=26) | 7.74 | 1.53 | 7.31** | 1.58* |
| Corn oil (n=20) | 7.66 | 1.26 | 7.45* | 1.32* |

* p< 0.1

** p< 0.01

As appears from Table 8 the test composition according to present application lowers total serum cholesterol significantly in patients with a total cholesterol of above 7.0 mmol/liter and raises HDL cholesterol significantly in the whole population. Similar, but weaker effects are obtained in the corn oil group.

The compositions according to present application further lowers LDL-cholesterol by 5-10% in patients with total cholesterol > 7mmol/l but has no significant effect in patients with an total cholesterol of < 6.5mmol/l.

Table 9

EFFECT OF TEST SUBSTANCE AND CORN OIL ON SERUM TRIGLYCERIDE

| <u>Triglyceride (mmol/l)</u> | | | | | |
|------------------------------|----|--------|-------|-----------|---------|
| Group | n | Before | After | Reduction | p-value |
| TEST SUBSTANCE | 87 | 1.51 | 1.20 | 0.31 | 0.001 |
| CORN OIL | 85 | 1.57 | 1.47 | 0.03 | NS |

Patients with triglycerides > 2.00 mmol/l

| Group | n | Before | After | Reduction | p-value |
|----------------|----|--------|-------|-----------|---------|
| TEST SUBSTANCE | 14 | 3.28 | 2.03 | 1.25 | 0.0001 |
| CORN OIL | 17 | 3.22 | 2.66 | 0.56 | 0.01 |

As appears from Table 9 the test substance has the effect of lowering the level of serum triglycerides especially in patients with high levels (>2.0mmol/l) before treatment. No significant effect is obtained with corn oil in the whole group of volunteers, whereas a very small effect is obtained in persons with high levels of triglycerides.

Table 10

EFFECT OF TEST SUBSTANCE AND CORN OIL
ON BLOOD PLATELET AGGREGATION

| Group | n | Collagen 0,2 ug/ml | | Collagen 0,1 ug/ml | |
|------------|----|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| | | Before | After | Before | After |
| | | \bar{X} SEM | \bar{X} SEM | \bar{X} SEM | \bar{X} SEM |
| TEST SUBST | 21 | 63.4 \pm 4.40 | 38.8 \pm 5.19 | 38.0 \pm 5.91 | 13.7 \pm 3.77 |
| CORN OIL | 21 | 73.5 \pm 4.40 | 57.4 \pm 6.37 | 43.4 \pm 45.5 | 15.2 \pm 3.32 |

As will appear from Table 10, the compositions according to present application have a blood platelet antiaggregating effect.

The coagulation factor VII-phospholipid complex is found in the plasma from men belonging to a high risk group for cardiovascular diseases, as described in P.Leren et al, [The Oslo Study, Cardiovascular diseases in middle aged and young Oslo men. Acta Med. Scand. suppl.588, 1-38, (1987)] and Dalaker et al, [A novel form of factor VII in plasma from men at risk for cardiovascular disease, Br.J. Haematol., 61, 315-322, (1985)], and is considered to be another risk factor for cardiovascular disease.

Table 11

EFFECT OF TEST SUBSTANCE AND CORN OIL
ON COAGULATION FACTOR VII PHOSPHOLIPID COMPLEX
ACTIVITY (PER CENT)

| Group | n | Before | After | Difference |
|------------|----|--------|-------|------------|
| TEST SUBST | 69 | 9.7 | 6.6 | 3.1 ** |
| CORN OIL | 72 | 8.5 | 8.8 | 0.3 N.S. |

** p<0.02

As appears from the table the activity is reduced significantly with the composition according to present application, whereas no significant effect is reached with corn oil.

According to the results shown in the tables 3-11 above, a composition according to present application has a significant effect on all the above mentioned risk factors for cardiovascular diseases. In comparison some positive results are obtained with corn oil but no significant effect is obtained for blood pressure, the level of serum triglycerides or for the activity of the coagulation factor VII. Further the effects measured in the corn oil group for these risk factors seem to be going in the opposite direction, being detrimental.

Thus fatty acid compositions according to the present invention are potentially valuable for the treatment and prophylaxis of multiple risk factors known for cardiovascular diseases, such as hypertension, hypertriglyceridemia and high coagulation factor VII phospholipid complex activity.

The doses of the composition of this invention needed for therapeutic or prophylactic effect will vary with the type of administration. In our large scale tests we administered 6 grams per person per day of the test composition. Generally for the average adult person the doses may vary from 1.0 to 10 grams depending upon body size and the seriousness of the condition to be treated.

The compositions according to present application may further be used as an additional drug to the customary hypertensive drug in treatment of hypertension. The doses will presumably lie in the lower part of the above mentioned dosage range.

Other possible medical indications for which the compositions according to present application may be administered are chronic polyarthritis, psoriatic artheritis, periarteritis nodosa, lupus erythematosus disseminatus (LED), scleroderma,

Crohn's disease, ulcerative colitis, psoriasis, atopic dermatitis and migraine as has been indicated in standard in vivo tests.

Perferably the active compounds should be orally administered in the form of pills, soft capsules or the like. However, the administration could also be through any other route where the active ingredients may be efficiently absorbed and utilized, e.g. intravenously, subcutaneously, rectally, vaginally or possibly topically.

The pharmaceutical composition may eventually comprise, in addition to the EPA and DHA active ingredients as defined, one or more pharmaceutically acceptable carrier as well known in the art. The compositions can also include fillers, stabilizers, extenders, binders, humidifiers, surfactants, lubricants and the like, as known in the art of formulating pharmaceutical composition.

In addition antioxidants, for example hydroxytoluene, butyrate, quinone, tocopherol, ascorbic acid etc., preservatives, colouring agents, perfumes, flavourings and other pharmaceutical agents may be used.

EXAMPLE OF PHARMACEUTICAL PREPARATIONSoft gelatine capsules containing 1g/per capsule

Composition:

| | |
|--------------------|-----------------|
| EPA ethyl ester | 525 mg/capsule |
| DHA ethyl ester | 315 mg/capsule |
| d-alpha Tocopherol | 4 IU/capsule |
| Gelatine | 246 mg/capsule |
| Glycerol | 118 mg/capsule |
| Red iron oxide | 2.27 mg/capsule |
| Yellow iron oxide | 2.27 mg/capsule |

The active ingredients and the excipients are weighted and homogenized on a high speed stirrer. The mixture is then colloid milled and deaerated in a stainless steel vessel ready for encapsulation. The mixture is filled in soft gelatine capsules of size 20 oblong, (average weight 1.4g) using a standard capsulation machine.

Claims

1. Fatty acid composition comprising at least 80% by weight of omega-3-fatty acids, whereof (all-Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid (EPA) C 20:5 and (all-Z)-4,7,10,-13,16,19-docosaenoic acid (DHA) C 22:6 are present in relative amounts of from 1:2 to 2:1 and constitute at least 75% by weight of the total fatty acids.
2. Composition according to claim 1, wherein other long chain fatty acids present are (all-Z C 21:5)-6,9,12,15,-18-heneicosapentaenoic acid, and/or (all-Z C 22:5)-7,10,13,16,19-eicosahexaenoic acid and/or (all-Z C 18:4)-6,9,12,15-octadecatetraenoic acid.
3. Composition according to claim 1 or claim 2, wherein the total concentration of long chain omega-3 fatty acids is at least 90% by weight, whereof EPA and DHA constitute at least 85% by weight of the total fatty acids and are present in relative amounts of EPA:DHA from 1:1 to 2:1, especially about 3:2 and the other long chain omega-3 C 20, C 21 and C 22 acids constitute at least 4.5% by weight.
4. Composition according to claim 1, wherein the total concentration of long chain omega-3 fatty acids is at least 95% by weight, where EPA and DHA constitute at least 90% by weight of the total fatty acids and the other long chain C 20, C 21 and C 22 acids constitute at least 4.5% by weight.
5. Composition according to claim 1 or claim 2 wherein the total concentration of long chain omega-3 fatty acids is at least 85% by weight, where EPA and DHA constitute at least 80% by weight and the other long chain C 20,

C 21 and C 22 acids constitute at least 4.5% by weight.

6. Composition according to claim 4 or 5 wherein EPA and DHA are present in relative amounts of from 1:1 to 2:1.
7. Composition according to claim 1 wherein the fatty acids are present in the form of pharmaceutically acceptable salts.
8. Composition according to claim 1 wherein the fatty acids are present in the form of derivatives.
9. Composition according to claim 8 wherein the derivative is an ester, especially an alkyl ester.
10. Composition according to claim 9 wherein the fatty acids are present in the form of ethyl esters.
11. Composition according to any of the above claims for the treatment or prophylaxis of multiple risk factors for cardiovascular diseases.
12. Method for the production of a fatty acid composition according to any of the claims 1-10, wherein main raw material is subjected to the following steps in optional sequence: transesterification, concentration via urea fractionation or the like, molecular distillation and/or supercritical fluid extraction or chromatography, whereby a main fraction consisting essentially of esters of the omega-3 C 20:5 and C 22:6 acids is isolated giving a total amount of long chain omega-3 fatty acid esters of at least 80% by weight, the urea fractionation and the molecular distillation being carried out under gentle conditions to avoid oxidation and isomerisation of the omega-3 acids.

13. Use of marine oil concentrate containing at least 80% long chain omega-3 fatty acids or salts or derivatives thereof, where (all-Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid (EPA) C 20:5 and (all-Z)-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid (DHA) C 22:6 are present in relative amounts of from 1:2 to 2:1 and constitute at least 75% by weight of the total long chain fatty acids, for the manufacture of a pharmaceutical preparation for the treatment or prophylaxis of multiple risk factors for cardiovascular diseases.
14. Method for the treatment or prophylaxis of multiple risk factors for cardiovascular diseases comprising administering a composition according to the claims 1-10 eventually in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier.
15. A process for the manufacture of a pharmaceutical composition for the treatment or prophylaxis of multiple risk factors for cardiovascular diseases, comprising incorporating with a pharmaceutically acceptable carrier or diluent a marine oil concentrate containing at least 80% by weight of long chain omega-3 fatty acids or salts or derivatives thereof, wherein (all-Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid (EPA) C 20:5 and (all-Z)-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid (DHA) C 22:6 are present in relative amounts of from 1:2 to 2:1 and constitute at least 75% by weight of the total fatty acids.



MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

D.G.P.I. - UFFICIO CENTRALE BREVETTI

BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

N. 1235879

Il presente brevetto viene concesso per l'invenzione oggetto della domanda sotto specificata:

| <i>num. domanda</i> | <i>anno</i> | <i>U.P.I.C.A.</i> | <i>data pres. domanda</i> | <i>classifica</i> |
|-------------------------|-------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| 21521 | 1989 | MILANO | 11/08/1989 | A-61K |

TITOLARE NORSK HYDRO A.S.
OSLO (NORVEGIA)

RAPPR. TE L. AIMI E ALTRI C/O
SOCIETA' ITALIANA BREVETTI S.P.A
VIA CARDUCCI, 5 MILANO

TITOLO COMPOSIZIONE DI ACIDI GRASSI
COMPREDENTE ALMENO 80% IN PESO DI
ACIDI GRASSI POLIINSATURATI OMEGA-3

INVENTORE HARALD BREIVIK
BERNT BORRETZEN
KNUT HELKAS DAHL
HANS EINAR KROKAN
KAARE H. BONAA

PRIORITA' GRAN BRETAGNA
DOM. BREV. INVENZIONE INDUSTRIALE
11 AGOSTO 1988 N. 8819110.1

ROMA, 23/11/1992

IL DIRIGENTE
(ITALBO BERTOCCHI)

Registro A

Protocollo n° **21521 A/89**

MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

Ufficio Provinciale Industria Commercio e Artigianato di Milano

COPIA DEL VERBALE DI DEPOSITO PER BREVETTO D'INVENZIONE INDUSTRIALE

L'anno 1989 il giorno UNDICI del mese di AGOSTO

La Ditta **NORSK HYDRO a.s.**
~~di Sognor~~di nazionalità norvegese con sede
~~residenza~~ in OSLO (Norvegia)

a mezzo mandatarî: F. de BENEDETTI - G. OMODESALE - P. PIZZOLI - M. ARRIGUCCI - S. ADORNO - L. AULI - S. CAREGARO
ed elettivamente domiciliata agli effetti di legge a Milano - Via G. CARDUCCI, 6
presso SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI S.p.A.
ha
presentato a me sottoscritto:

- Domanda in bollo per la concessione di un BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

avente per

TITOLO:**"COMPOSIZIONE DI ACIDI GRASSI"**

Inventori designati: Harald BREIVIK, Bernt BØRRETZEN, Knut Helkås DAHL,
Hans Einar KROKAN e Kaare H. BØNAA

Priorità della domanda di brevetto in: GRAN BRETAGNA, N°8819110.1 dell'11 Agosto 1988

corredata di:

- Descrizione in duplo di n. 32 pagine di scrittura.

~~Il disegno è depositato in duplo~~

- Lettera d'incarico - Dichiarazione di esclusione di diritti di proprietà con riserva

- Documento di priorità e traduzione italiana con riserva

~~Il presente documento è depositato in duplo~~~~Il presente documento è depositato in duplo~~

- Attestazione di versamento sul c/c postale n. 00668004 intestato all'Ufficio del Registro tasse e concessioni al
Roma di L. 328.000.= emessa dall'Uff. Postale di Milano 28 il 11.8.1989 n.VCC 0060

- Marca da bollo da L. 5.000

La domanda, le descrizioni ed i disegni sopraelencati sono stati firmati dal richiedente e da me controfirmati e bollati col timbro d'ufficio

IL DEPOSITANTE

See Jalee

L'UFFICIALE ROGANTE

ANGELO PONGHI

p. il Direttore
(Benito Boschetto)

CESARE BAMELLINI

Per copia conforme all'originale

«Si precisa che per tale domanda e allegati l'imposta di bollo è stata assolta conformemente alla circolare n° 183/83 dell'U.C.B. e succ. modif., con riserva di eventuali integrazioni che saranno dallo stesso richieste in sede di concessione.»



Al Ministero dell'Industria, Commercio e Artigianato

Ufficio Centrale Brevetti - ROMA

La ditta norvegese NORSK HYDRO a.s., con sede in

OSLO (Norvegia)

rappresentata dal sottoscritto mandatario domicilia-

to nella sede della SOCIETA' ITALIANA BREVETTI S.p.A.

in Milano - Via Carducci, 8 - con domicilio eletto

presso detta Società, domanda la concessione di un

brevetto per l'invenzione avente per titolo:

"COMPOSIZIONE DI ACIDI GRASSI COMPRENDENTE ALMENO

80% IN PESO DI ACIDI GRASSI POLINSATURI OMEGA-3" }

Si designano qual* / i inventore* / i: Harald BREIVIK,
Bernt BØRRETZEN, Knut Helkås DAHL, Hans Einar KROKAN
e Kaare H. BØNAA.

Si rivendica il diritto di priorità derivante
dalla* precedente* domanda* di brevetto deposita-
ta* in GRAN BRETAGNA l'11 Agosto 1988 N°8819110.1

Documentazione depositata:

-) Descrizione dell'invenzione in duplice copia di

N° 32 pagine di scrittura;

XX

-) Lettera d'incarico, (con riserva)

-) Doc. di priorità con trad.ne italiana, con riserva

-) Attestazione del versamento di Lire 328.000.- effet-

| |
|---------------------------------------|
| UFFICIO CENTRALE SERVIZIO BREVETTI |
| 11.08.89 021521 |
| Ch... .. |

21521 A/89

tuato sul c/c N°668004 il 11.8.1989

-) Marca da bollo da Lire 5.000.-

Il Mandatario:

Luciano Armi
Dr. Luciano Armi
N° iscr. Albo 199

(Società Italiana Brevetti S.p.A.)

Milano, 11 Agosto 1989



STAMPA

S.I.B.
MI.

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"COMPOSIZIONE DI ACIDI GRASSI" ✓

a nome della ditta norvegese NORSK HYDRO a.s. con
sede a OSLO (Norvegia)

Descrizione industriale
(art. 43 D.P.R. n. 350/1976)
Istanza dep. B

depositata il 11 AGO. 1989

con N. 21521 A/89

Inventori: Harald BREIVIK, Bernt BØRRETZEN, Knut
Helkås DAHL, Hans Einar KROKAN e Kaare
H. BØNAA

Descrizione industriale
(art. 43 D.P.R. n. 350/1976)
Istanza dep. B

5-3-1990

RIASSUNTO

Composizione di acidi grassi comprendente almeno l'80% in peso di acidi grassi omega-3, di loro sali o derivati, in cui l'acido 5,8,11,14,17-eicosapentenoico (EPA) e l'acido 4,7,10,13,16,19-docosahesenoico (DHA) aventi tutti i doppi legami in configurazione cis costituiscono almeno il 75% in peso degli acidi grassi totali. Le composizioni possono essere usate per il trattamento o la profilassi di fattori di rischio multiplo per disturbi cardiovascolari.

La presente invenzione riguarda una composizione di acidi grassi comprendente almeno l'80% in peso di acidi grassi poliinsaturi omega-3, in cui almeno il 75% in peso degli acidi grassi totali ✓

S.I.B.
M.I.

comprende l'acido 5,8,11,14,17-eicosapentenoico (EPA) C 20:5 e l'acido 4,7,10,13,16,19-docosaesanoico (DHA) C 22:6 omega-3, in cui tutti i doppi legami presentano configurazione cis (condizione indicata brevemente nel seguito come ("tutti Z").

Campo dell'invenzione

I disturbi cardiovascolari che portano a morbidità e a mortalità prematura sono correlati a vari fattori di rischio come l'ipertensione, l'ipertrigliceridemia, l'ipercolesterolemia, elevata aggregazione delle piastrine del sangue e, secondo recenti scoperte, un'alta attività del fattore VII complesso fosfolipidico di coagulazione del sangue. Negli ultimi decenni, farmaci anti-ipertensivi hanno contribuito alla diminuzione della morbidità e mortalità riferita a disturbi cardiovascolari. Vi è tuttavia una accresciuta preoccupazione circa gli effetti collaterali e la tossicità associati con la consueta terapia antipertensiva, particolarmente in pazienti con ipertensione lieve. Vi sono risultati che indicano che, sebbene gli agenti antiipertensivi attualmente usati siano efficaci nel ridurre la pressione sanguigna, il ritmo delle pulsazioni è contemporaneamente aumentato. Vi è così la necessità di un farmaco con minori effetti negativi per il trattamento

S.I.B.
M.I.

della ipertensione. Sarebbe particolarmente vantaggioso se tale farmaco potesse essere usato per il trattamento simultaneo di tutti i fattori di rischio multiplo sopra accennati, associati con disturbi cardiovascolari, il che non è generalmente il caso dei farmaci antipertensivi attualmente disponibili.

Descrizione della tecnica antecedente

Durante l'ultimo decennio sono apparse numerose pubblicazioni le quali riferiscono che varie preparazioni dietetiche a base di olio di pesce contenenti acidi grassi polinsaturi omega-3 presentano una azione sul colesterolo serico e sulla aggregazione delle piastrine sanguigne. I meccanismi suggeriti per queste azioni sono spesso accentrati attorno al sistema delle prostaglandine. Vi è così una certa informazione su come gli olii dietetici di pesce alterano l'escrezione di certi metaboliti prostaglandinici, ma dati disponibili contrastano su vari punti.

Una riduzione della pressione sanguigna è stata riferita dopol'assunzione di pesce, di olio di pesce grezzo (a partire da 7% di EPA e 5% di DHA) o di preparazioni lievemente concentrate di olio di pesce (contenenti tipicamente il 18% di EPA e il 12% di DHA), sebbene i componenti responsabili di queste

S.I.B.
M.I.

azioni non siano mai stati identificati. Inoltre, tutti gli studi presentati fino ad ora contenevano una o più pecche gravi, come sottolineato in rassegne degli studi disponibili [H.R. Knapp et al., Proceedings of AOCS Short Course on polyunsaturated Fatty Acids and Eicosanoids, curatore W.E.M. Lands, pagg. 41-55, American Oil Chemists Society] e [K. Bónaa, Tidskr. Nor. Laegeforen N. 28, 1987, 2425-8].

L'acido eicosapentenoico C 20:5 omega-3 (EPA) è stato considerato il più importante degli acidi grassi marini polinsaturi omega-3, in parte a causa della sua potente azione antiaggregante, riferita fra l'altro nel brevetto US N. 4097602, Silver et al., che fu depositato nell'agosto 1974. Successivamente, Dyerberg et al. hanno pure descritto lo stesso effetto in [Lancet, pag. 152, 21 gennaio 1978] e [Lancet II, pagg. 117-119, 15 luglio 1978]. La ragione principale della supposta importanza del EPA è probabilmente il fatto che esso appartiene agli eicosanoidi, i quali sono sostanze chiave nel metabolismo delle prostaglandine.

Tuttavia, secondo varie recenti relazioni, il solo EPA non presenta una azione significativa sulla ipertensione. In "Effects of highly purified eicosapentaenoic acid to angiotensin II and norepinephrine

S.I.B.
M.

in the rabbit", [Prostaglandins Agosto 1986, Vol. 32, N. 2, pagg. 179-187] non fu ottenuta alcuna riduzione della pressione sanguigna nei conigli usando EPA depurato alla concentrazione del 90%. Terano et al. [Atherosclerosis, 46, 321-331, (1983)] hanno riferito che una preparazione contenente il 75% di EPA e 6,2% di DHA non presentava una azione significativa sulla pressione sanguigna in volontari sani, dopo una assunzione di 3,6 g di estere etilico EPA. Analogamente, Yoshida et al. [Artery, 14, 295-303, 1987] hanno riferito che nessun effetto si è verificato sulla pressione sanguigna basale dopo l'assunzione di 900 mg di estere etilico di EPA per 14 giorni o più. Inoltre l'estere etilico di EPA al 90% non aveva alcun effetto su ratti spontaneamente ipertesi [K. Yin et al., 1988, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 15, 275-280].

Contrariamente a ciò, la domanda di brevetto britannico 2197199 descrive una composizione per combattere l'ipertensione indotta da gravidanza, dove le composizioni usate negli esempi avevano un contenuto di EPA del 28-35%. Le pazienti non presentavano anamnesi di ipertensione. L'ipertensione che si sviluppa durante la gravidanza è considerata avere cause biologiche diverse dalla ipertensione

S.I.B.
M.I.

normale, il che sembra essere sottolineato dal fatto che essa di solito scompare al termine della gravidanza.

Da quanto ci risulta, non vi è nulla che suggerisca che il solo DHA presenti qualche azione sulla pressione sanguigna.

Secondo il brevetto US 3082228 basato su una domanda depositata il 18 dicembre 1959, un prodotto contenente almeno il 60% di acidi grassi polinsaturi aventi 20 atomi di carbonio o più abbassa in modo significativo il contenuto di colesterolo del sangue. Sebbene altri studi precedenti indichino che gli olii di pesce abbassano il colesterolo totale ed il colesterolo LDL e fanno aumentare il colesterolo HDL, risultati successivi hanno tratto generalmente la conclusione opposta, come sottolineato da W.S. Harris in [(n-3)news, 3 (4), 1-7]. Così, riassumendo 45 articoli sull'argomento, egli ha trovato che il colesterolo LDL risultava aumentato del 2-30%, secondo il tipo della iperlipidemia.

Dalla domanda di brevetto PCT/WO 87/02247 è nota una emulsione lipidica per l'uso parenterale comprendente un emulsionante, acqua ed un olio marino contenente almeno un acido grasso omega-3, in cui la concentrazione dell'acido grasso libero nella

emulsione è inferiore a circa 5 meq/l, ed in cui l'olio marino contiene almeno il 30% in peso di una combinazione di esteri di EPA e di DHA. Questa emulsione lipidica è usata per il trattamento endovenoso di stati morbosi trombotici.

Sommario dell'invenzione

Si è ora trovato che composizioni di acidi grassi contenenti una elevata concentrazione, di almeno l'80% in peso, di acidi grassi omega-3, di loro sali o derivati, in cui EPA e DHA sono presenti in quantità rispettive di 1:2 fino a 2:1 e costituiscono almeno il 75% degli acidi grassi complessivi, presentano una azione sorprendentemente vantaggiosa su tutti i suddetti fattori di rischio di malattie cardiovascolari, ma particolarmente un buon effetto sulla ipertensione lieve, sulla ipertrigliceridemia e sulla attività del fattore VII di coagulazione a base di complesso fosfolipidico. Esse abbassano il colesterolo LDL serico fanno aumentare il colesterolo HDL serico, abbassano i trigliceridi serici, abbassano la pressione sanguigna sistolica e diastolica ed il ritmo delle pulsazione ed attenuano l'attività del fattore VII di coagulazione del sangue a base di complesso fosfolipidico. Sebbene i particolari meccanismi biologici responsabili degli effetti

S.I.B.
M.I.

delle composizioni secondo la presente invenzione non siano chiaramente noti, vi sono indicazioni di un sorprendente sinergismo fra le azioni del EPA e del DHA.

Un vantaggio delle composizioni secondo la presente invenzione è che esse sono molto ben tollerate, non dando luogo ad alcun effetto collaterale serio.

Una composizione particolarmente preferita secondo la presente invenzione comprende almeno il 90% in peso di acidi grassi poliinsaturi omega-3 a catena lunga, in cui EPA e DHA costituiscono almeno l'85% in peso degli acidi grassi complessivi e sono presenti in un rapporto di EPA:DHA di 1:1 fino a 2:1, in particolare circa 3:2.

Allo scopo di isolare EPA e DHA in una miscela ad elevata concentrazione secondo la presente invenzione, è stato sviluppato un procedimento speciale per depurare ed isolare gli acidi grassi a lunga catena da olii di pesce naturali. Le composizioni secondo la presente invenzione possono essere prodotte secondo il procedimento della domanda di brevetto europeo N. 86906964.1 della stessa richiedente. L'analisi in percentuale ponderale fu basata sugli esteri etilici, anche se altri derivati e sali

SUB
M

o gli stessi acidi fanno pure parte della presente invenzione.

Descrizione particolareggiata dell'invenzione

La composizione secondo la presente invenzione è preferibilmente prodotta mediante il seguente procedimento. Inizialmente il materiale grezzo a base di olio marino viene esterificato e concentrato mediante frazionamento con urea o simili, laddove le condizioni sono sufficientemente blande da evitare la degradazione dei prodotti. La seconda fase è una distillazione molecolare.

Il frazionamento rimuove all'inizio principalmente la maggior parte degli esteri aventi una lunghezza di catena inferiore a C 20. In seguito viene allontanata una frazione principale costituita sostanzialmente da esteri degli acidi C 20 e C 22. Poichè il frazionamento con urea rimuove gli esteri saturi e meno insaturi, questa frazione conterrà alte concentrazioni di EPA e di DHA, almeno il 75% in peso secondo il presente procedimento. La quantità totale degli acidi omega-3 a lunga catena sarà di almeno 80% in peso. Altre composizioni preferite secondo la presente invenzione contengono almeno il 95% in peso, il contenuto di EPA più DHA essendo almeno 90% in peso. Un'altra composizione preferita

S.I.B.
S.I.B.

secondo la presente invenzione contiene almeno 85% in peso degli acidi grassi omega-3 complessivi ed una quantità di EPA e DHA di almeno 80% in peso.

Altri acidi omega-3 della serie C20, C21 e C22 saranno ottenuti all'incirca nelle loro concentrazioni originarie, ad esempio 3-5% in peso, tipicamente almeno 4,5% in peso. Così, il particolare acido 6, 9, 12, 15, 18-eneicosapentenoico omega-3 di numero dispari C 21:5 tutti Z è normalmente presente in concentrazioni di almeno 1,5% in peso e l'acido 7, 10, 13, 16, 19-docosapentenoico omega-3 tutti Z normalmente in concentrazioni di circa 3,0% in peso.

Dopo asportazione del precipitato ureico, il solvente utilizzato, normalmente etanolo, è parzialmente o completamente rimosso mediante evaporazione e gli esteri così isolati possono essere ulteriormente depurati mediante lavaggio con acqua o con una soluzione acquosa lievemente alcalina, se devono essere isolati gli esteri puri senza contaminazione degli acidi.

Gli acidi liberi possono essere prodotti mediante ben note procedure di idrolisi.

L'accrescimento della frazione EPA per ottenere un rapporto ponderale di EPA:DHA da 1:1 a 2:1, in particolare 3:2, o l'accrescimento della frazione



DHA per ottenere un rapporto ponderale EPA:DHA da 1:1 a 1:2 può essere ottenuto nello stadio della distillazione molecolare. Il metodo fornisce anche la possibilità di usare l'estrazione supercritica con liquidi e/o la cromatografia nella seconda fase con CO_2 contenente alla fine un modificatore più polare, come etanolo, allo scopo di concentrare la frazione EPA e/o DHA.

Il frazionamento con urea e la successiva distillazione molecolare sono effettuati in condizioni blande per evitare l'ossidazione e/o l'isomerizzazione degli acidi omega-3 molto instabili. Come si vede dalle seguenti tabelle 1 e 2 che riportano l'analisi di prodotti ottenuti secondo il procedimento della presente invenzione, nel prodotto depurato non vi era più dell'1% di componenti ignoti. Vi è tuttavia una certa quantità di prodotti minori, come acidi C-16 e C-18, come risulterà dalla analisi particolareggiata mostrata nella tabella 2.

Per la maggior parte, questi prodotti saranno la somma combinata della frazione di esteri di acidi grassi che si presentano naturalmente negli oli di pesce, ma la concentrazione di ciascun estere separato nel prodotto finito è inferiore a 0,2%, a prescindere dall'acido ottadecatetraenoico omega-3

S. I. B.
M.

C-18:4 n-3, che è presente all'incirca nella stessa quantità contenuta nel materiale di partenza.

Si comprenderà così che la concentrazione totale di sottoprodotti derivanti dal procedimento è molto bassa.

Il procedimento è abbastanza flessibile da influire sui rapporti relativi fra gli acidi grassi a lunga catena C20, C21 e C22 che si presentano naturalmente nelle materie prime disponibili a base di olio di pesce. Esso non soltanto fornisce l'incremento dei singoli acidi, ma fa anche sì che il rapporto fra essi resti compreso in un ambito di variazione che in natura risulta ottimale. Vi è tuttavia contemporaneamente la possibilità di compensare le variazioni talvolta estreme che possono verificarsi naturalmente, come risulta nel seguito. Sarà così possibile ottenere un prodotto avente composizione costante e predeterminata.

Gli olii di pesce possono anche contenere sottoprodotti e contaminanti, come pesticidi, idrocarburi clorurati, metalli pesanti, colesterolo e vitamine. Durante la produzione del concentrato, le concentrazioni di questi componenti vengono significativamente ridotte rispetto ad olii di pesce non trattati.

S.I.R.
di

In natura, i contenuti relativi di EPA e di
DHA, nonché di altri acidi omega-3 a lunga catena
dipende dalle specie marine e all'interno delle
stesse specie si hanno pure variazioni stagionali.
Negli Stati Uniti d'America l'olio di pesce è at-
tualmente prodotto prevalentemente a partire da
alosa. Questo olio contiene tipicamente 14-19% di
EPA e 5-8% di DHA. L'analisi di una partita di olio
di fegato di merluzzo mostrò un contenuto di 6,9 di
EPA e di 8,4 di DHA. Per il malloto, i valori di
EPA variarono dall'8,6 all'11,4 dal gennaio 1973
all'agosto 1973, mentre i valori di DHA variarono
da 6,7% a 11% durante lo stesso periodo. Per l'arin-
ga costiera norvegese, il contenuto nell'ottobre
1974 era di 6,4% di EPA e di 9,8% di DHA, mentre
catture effettuate nel novembre 1975 mostrarono una
riduzione rispettivamente a 1,7% e a 1,1%.

Queste variazioni significano che l'assunzione
dietetica di olii di pesce o di solo pesce non assi-
cura una fornitura costante di acidi omega-3. Anche
se tutti gli acidi omega-3 a lunga catena C-20,
C-21 e C-22 non risulteranno o risulteranno soltanto
moderatamente aumentati durante il procedimento,
essi saranno conservati almeno nei loro rapporti
originali.

S.I.B.
M.I.

Nella tabella 1, la colonna di sinistra mostra le variazioni tipiche fra i contenuti di singoli acidi a lunga catena nelle composizioni della presente invenzione, mentre la colonna di destra mostra l'analisi esatta del campione di prova usato nello studio degli effetti biologici, i cui risultati sono mostrati nelle seguenti tabelle da 4 a 8.

TABELLA 1

| | Variazione caratteristica del prodotto | | Campione di prova | |
|----------------------------------|---|-----|-------------------|-----|
| | 1- 2 | | 1,4 | |
| C 20:4 omega-6 | 40-60 | p % | 54 | p % |
| C 20:5 omega-3 | 1- 4 | " | 1,5 | " |
| C 21:5 omega-3 | 1- 3 | " | 2 | " |
| C 22:5 omega-3 | 25-45 | " | 32,6 | " |
| C 22:6 omega-3 | 3- 8,5 | " | 7,5 | " |
| acidi inferiori | 1 | " | 1 | " |
| ignoto | | | 90.1 | " |
| Somma degli acidi grassi omega-3 | | | 86.6 | " |
| Somma EPA + DHA | | | 3.3 | : 2 |
| EPA : DHA | | | | |

S. P.
M.

La tabella 2 mostra una analisi dettagliata di una partita di materiale di partenza e di un'altra composizione della presente invenzione ottenuta da esso.

TABELLA 2

| <u>Composizione in acidi grassi.. (%)</u> | | |
|---|--|---|
| <u>Acido grasso</u> | <u>Materiale di partenza Olio di pesce</u> | <u>Prodotto in estere etilico Campione di prova</u> |
| C14:0 | 7.6 | 0.0 |
| Pristanato | 0.4 | 0.0 |
| C16:0 | 19.1 | 0.0 |
| C16:1 n7 | 7.2 | 0.0 |
| 7-Me16:0 | 0.3 | 0.0 |
| C16:2 n6 | 0.5 | 0.0 |
| C16:2 n4 | 1.2 | 0.0 |
| Fitanato | 0.3 | 0.0 |
| C16:3 n4 | 0.5 | 0.0 |
| C16:4 n1 | 1.0 | 0.2 |
| C18:0 | 2.3 | 0.0 |
| C18:1 n9 | 9.1 | 0.0 |
| C18:1 n7 | 3.0 | 0.0 |
| C18:1 n5 | 0.4 | 0.1 |
| C18:2 n6 | 1.1 | 0.0 |
| C18:2 n4 | 0.2 | 0.0 |
| C18:3 n6 | 0.2 | 0.2 |
| C18:3 n3 | 0.7 | 0.2 |
| C18:4 n3 | 2.5 | 2.8 |
| C18:4 n1 | 0.1 | 0.2 |
| C20:1 n9+7 | 5.9 | 0.0 |
| C20:1 | 0.1 | 0.0 |
| C20:2 n6 | 0.2 | 0.1 |
| C20:3 n6 | 0.1 | 0.0 |
| C20:4 n6 | 0.7 | 1.4 |
| C20:4 n3 | 1.2 | 0.9 |
| C20:5 n3 | 16.5 | 53.4 |
| C22:1 n11+9 | 4.6 | 0.0 |
| C22:2 n6 | 0.7 | 0.0 |
| C21:5 n3 | 0.9 | 1.6 |
| C22:4 n6 | 0.1 | 0.0 |
| C22:5 n6 | 0.1 | 0.4 |
| C22:5 n3 | 2.0 | 3.1 |
| C22:6 n3 | 7.9 | 34.3 |
| Somma ignota | 1.0 | 1.0 |
| Somma di acidi grassi omega-3 | 31.7 | 95.4 |
| Compreso C-18 | 3.2 | 3.0 |
| Somma EPA +DHA | 24.4 | 87.7 |
| EPA : DHA | 2.1 : 1 | 3.1 : 2 |

S.I.B.
M.I.

La tabella 3 mostra i principali contenuti in acidi grassi di diverse composizioni secondo la presente invenzione.

TABELLA 3

| Acido grasso | Composizione (%) | | | | | |
|-------------------------------|------------------|-------|-------|-------|------|-------|
| C18:2 n6 | 0.3 | 0.3 | 0.1 | 0.0 | 0.2 | 0.1 |
| C18:3 n3 | 0.3 | 0.3 | 0.0 | 0.1 | 0.3 | 0.0 |
| C18:4 n3 | 2.3 | 2.3 | 3.6 | 2.2 | 1.8 | 0.7 |
| C18:4 n1 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.3 | 0.0 | 0.0 |
| C20:4 n6 | 1.7 | 1.7 | 1.5 | 3.9 | 1.6 | 1.6 |
| C20:4 n3 | 2.4 | 0.9 | 1.3 | 1.2 | 1.9 | 0.3 |
| C20:5 n3 | 54.7 | 52.7 | 42.2 | 48.5 | 41.0 | 31.7 |
| C21:5 n3 | 2.1 | 2.1 | 1.7 | 2.0 | 1.7 | 1.2 |
| C22:5 n6 | 0.4 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 0.7 | 1.1 |
| C22:5 n3 | 5.4 | 5.8 | 2.8 | 4.3 | 5.8 | 3.3 |
| C22:6 n3 | 28.7 | 31.0 | 38.0 | 34.9 | 42.4 | 58.5 |
| Somma di FA n-3 compreso C 18 | 95.9 | 95.1 | 89.6 | 93.2 | 94.9 | 95.7 |
| Somma EPA+DHA | 83.4 | 83.7 | 80.2 | 83.4 | 83.4 | 90.2 |
| EPA : DHA | 1.9:1 | 1.7:1 | 1.1:1 | 1.4:1 | 1:1 | 1:1.8 |

FA n-3 indica acidi grassi omega-3

EFFETTI BIOLOGICI

Allo scopo di valutare l'effetto di una composizione secondo la presente invenzione sulla pressione sanguigna, sul ritmo delle pulsazioni, sui livelli di trigliceridi, sul colesterolo serico e sul colesterolo HDL, sull'aggregazione delle piastrine del sangue e sull'attività del fattore di coagulazione VII da complesso fosfolipidico, l'intera popolazione dell'età fra 34 e 60 anni di una

S. I. P.
M. I.

piccola città norvegese fu invitata ad una visita di controllo e, fra queste, 22.000 persone furono selezionate per i seguenti criteri.

- Ipertensione moderata non trattata da pressione sanguigna diastolica (DBP) variabile da 89 a 111 mm Hg e pressione sanguigna sistolica (SBP) da 110 a 180 mm Hg.
- nessuna precedente malattia cardiaca e nessun impiego di farmaci cardiaci
- nessun grave disturbo
- non in sovrappeso eccessivo
- nessun alcoolismo
- colesterolo serico di almeno 6,0 mmol/litro.

Il gruppo di volontari scelto secondo questi criteri ammontò a 172. I volontari furono esaminati durante un periodo di rodaggio di 6 mesi per assicurare la stabilizzazione della pressione sanguigna prima che fosse somministrata la sostanza in prova. Tutte le misure della pressione sanguigna furono effettuate con uno strumento automatico (Dinamap) e in ogni occasione furono effettuate tre misurazioni (a 2 minuti di intervallo) in posizione seduta e in piedi in condizioni controllate. Fu utilizzata la media delle due ultime misurazioni in posizione seduta e in piedi.

S. I. B.
M.

Lo studio fu uno studio controllato a doppio cieco. I 172 volontari furono divisi in due gruppi casuali della stessa grandezza. Un gruppo fu trattato con capsule placebo di olio di mais contenente ciascuna un grammo di olio di mais addizionato dello 0,3% di vitamina E. L'altro gruppo ricevette capsule contenenti 1 grammo della sostanza in prova la cui composizione è riportata nella tabella 1. Entrambe le serie di capsule furono prodotte con gelatina tenera colorata per assicurare l'effetto a doppio cieco. Ai volontari fu richiesto di assumere due volte al giorno tre capsule della sostanza di prova o di controllo per 11 o 12 settimane. 171 volontari completarono lo studio ed in media furono assunte circa il 90% delle capsule.

Come risulterà dalle seguenti tabelle 4 e 5, l'olio di mais non ebbe statisticamente alcun effetto significativo sulla pressione sanguigna. L'effetto della sostanza di prova sulla pressione sanguigna fu accertato dapprima sull'intero gruppo che assumeva la sostanza in prova e successivamente sui soggetti con le pressioni sanguigne più elevate. Le pressioni sanguigne medie per i pazienti con pressioni sanguigne più elevate all'inizio e alla fine del trattamento con la sostanza attiva in prova della

S
L
M

presente invenzione sono riportate nella tabella 4
(pressione sanguigna diastolica) e nella tabella 5
(pressione sanguigna sistolica).

TABELLA 4

EFFETTO DELLA SOSTANZA IN PROVA E DELL'OLIO DI MAIS
SULLA PRESSIONE SANGUIGNA DIASTOLICA

| Inter- vallo DBP | Numero di pazienti | DBP media prima del trattamento (mm Hg) | DBP media dopo il trattamento (mm Hg) | Riduzione media della DBP (mm Hg) | Significato |
|--------------------------|--------------------------|--|--|--|-------------|
| <u>Sostanza in prova</u> | | | | | |
| 85-109 | 62 | 95.8 | 93.4 | 2.4 | p<0.05 |
| 98-109 | 22 | 102 | 96.2 | 5.8 | p<0.01 |
| <u>Olio di mais</u> | | | | | |
| 85-109 | 57 | 95.7 | 96.0 | 0 | n.s. |
| 98-109 | 26 | 101.8 | 100.7 | 1.1 | n.s. |

n.s. significa non significativa

TABELLA 5

EFFETTO DELLA SOSTANZA IN PROVA E DELL'OLIO DI MAIS
SULLA PRESSIONE SANGUIGNA SISTOLICA

| SBP di pazienti (mm Hg) | Numero di pazienti | SBP media prima del trattamento (mm Hg) | SBP media dopo il trattamento (mm Hg) | Riduzione media della SBP (mm Hg) | Significato |
|-------------------------------|--------------------------|--|--|--|-------------|
| <u>Sostanza in prova</u> | | | | | |
| > 135 | 71 | 148.1 | 144.5 | 3.6 | p<0.05 |
| > 150 | 24 | 158.4 | 150.3 | 8.1 | p<0.001 |
| > 155 | 15 | 162.2 | 152.4 | 9.8 | p<0.001 |
| <u>Olio di mais</u> | | | | | |
| > 135 | 62 | 148.5 | 149.6 | 0 | n.s. |
| > 150 | 23 | 159.1 | 158.0 | 1.1 | n.s. |
| > 155 | 17 | 161.8 | 159.6 | 2.2 | n.s. |

S.I.B.
M.I.

Come è evidente dalle tabelle sopra riportate, la sostanza in prova aveva un effetto ipotensivo molto significativo sia sulla pressione sistolica che su quella diastolica. E' anche chiaro che l'effetto è massimo in quei pazienti con pressione sanguigna massima. Nessun effetto significativo fu ottenuto nel gruppo che assumeva olio di mais.

TABELLA 6

EFFETTO DELLA SOSTANZA IN PROVA E DELL'OLIO DI MAIS
SULLA PRESSIONE SANGUIGNA SISTOLICA E DIASTOLICA
SECONDO UNA ASSUNZIONE DIETETICA DI PESCE (PIATTI PER SETTIMANA)

| Piatti per Numero settimana di pazienti | | BP media prima del trattamento (mm Hg) | BP media dopo il trattamento (mm Hg) | Riduzione media della BP (mm Hg) | Significato |
|---|----|---|---|---|-------------|
| <hr/> Sostanza in prova | | | | | |
| 0-2 | 44 | SBP 145.3 | 139.3 | -6.9 | p=0.005 |
| | | DBP 99.8 | 94.0 | -5.7 | p=0.0001 |
| 3-5 | 34 | SBP 143.6 | 141.2 | -2.4 | p=0.2 |
| | | DBP 97.7 | 96.3 | -1.4 | p=0.2 |
| <hr/> | | | | | |
| Olio di mais | | | | | |
| 0-2 | 34 | SBP 145.2 | 146.8 | +1.6 | p=0.4 |
| | | DBP 98.3 | 100.2 | +1.9 | p=0.1 |
| 3-5 | 44 | SBP 142.3 | 143.4 | +1.1 | p=0.5 |
| | | DBP 97.4 | 97.9 | +0.5 | p=0.7 |

SIR
M

Come risulta dalla tabella 6, un buon effetto ipotensivo con la composizione secondo la presente invenzione è ottenuto sorprendentemente anche nel gruppo con una elevata assunzione dietetica di pesce di 3-5 piatti per settimana. Al confronto nessun effetto benefico è ottenuto con l'olio di mais.

I risultati mostrati sopra indicano che una composizione secondo la presente invenzione fornisce sorprendentemente un effetto molto migliore di quanto porterebbe ad attendersi una assunzione dietetica di pesce o di olio di mais leggermente concentrato. Ciò è dovuto probabilmente ad un effetto sinergico di EPA e DHA.

Confrontati con i risultati di prova ottenuti negli studi precedentemente condotti con una assunzione dietetica di olii di pesci di mare, i risultati ottenuti con una composizione secondo la presente invenzione mostrano un sorprendente miglioramento dell'azione sulla pressione sanguigna diastolica e sistolica di pazienti lievemente ipertesi e rispettivamente dei pazienti maggiormente ipertesi, di circa 30% e 45%.

S.I.B.
M.I.

TABELLA 7

EFFETTO DELLA SOSTANZA IN PROVA E DELL'OLIO DI MAIS
SUL RITMO DELLE PULSAZIONI (PER MINUTO)

| Gruppo | Prima | Dopo | Variazione | Significato |
|----------------------|-------|------|------------|-------------|
| Sostanza in prova | | | | |
| stando | 75.4 | 73.2 | -2.2 | p<0.02 |
| seduti | 82.9 | 80.2 | -2.7 | p<0.005 |
| Olio di mais | | | | |
| stando | 74.3 | 75.1 | +0.8 | p=0.3 |
| seduti | 80.9 | 82.2 | +1.3 | p=0.2 |

Lo studio del ritmo delle pulsazioni comprendeva 78 persone nel gruppo che ricevette la sostanza in prova e 77 persone nell'altro gruppo.

Come risulterà dalla tabella sopra riportata, fu ottenuta una significativa diminuzione nel ritmo delle pulsazioni con la sostanza in prova secondo la presente invenzione ed un leggero aumento non significativo del ritmo delle pulsazioni con olio di mais.

TABELLA 8

EFFETTO DELLA SOSTANZA IN PROVA E DELL'OLIO DI MAIS
SUL COLESTEROLO SERICO [mmoli/litro]

| GRUPPO | PRIMA | | DOPO | |
|-----------------------------|-----------|----------|-----------|----------|
| | Col. tot. | Col. HDL | Col. tot. | Col. HDL |
| <u>Tutti i pazienti:</u> | | | | |
| Sostanza in prova (n=78) | 6.58 | 1.35 | 6.57 | 1.41** |
| Olio di mais (n=78) | 6.68 | 1.33 | 6.64 | 1.41** |
| <u>Colesterolo totale 7</u> | | | | |
| Sostanza in prova (n=26) | 7.74 | 1.53 | 7.31** | 1.58* |
| Olio di mais (n=20) | 7.66 | 1.26 | 7.45* | 1.32* |

* p< 0.1
** p< 0.01

S.I.B.
M.I.

Come risulta chiaro dalla tabella 8, la composizione in prova secondo la presente invenzione abbassa significativamente il colesterolo serico totale in pazienti con colesterolo totale superiore a 7,0 mmoli/litro e fa aumentare in modo significativo il colesterolo HDL dell'intera popolazione. Effetti simili, ma più deboli, sono ottenuti nel gruppo dell'olio di mais.

Le composizioni secondo la presente invenzione abbassano ulteriormente il colesterolo LDL del 5-10% in pazienti con colesterolo totale superiore a 7 mmoli/litro, ma non hanno effetto significativo in pazienti con un colesterolo totale minore di 6,5 mmoli/litro.

TABELLA 9

EFFETTO DELLA SOSTANZA IN PROVA E DELL'OLIO DI MAIS
SUI TRIGLICERIDI SERICI

| | | <u>Trigliceridi (mmoli/litri)</u> | | | | |
|-------------------|----|-----------------------------------|------|-----------|----------|-------|
| Gruppo | n | Prima | Dopo | Riduzione | Valore p | |
| SOSTANZA IN PROVA | 87 | 1.51 | 1.20 | | 0.31 | 0.001 |
| OLIO DI MAIS | 85 | 1.57 | 1.47 | | 0.03 | NS |

Pazienti con trigliceridi 2,00 mmoli/litro

| Gruppo | n | Prima | Dopo | Riduzione | Valore p | |
|-------------------|----|-------|------|-----------|----------|--|
| SOSTANZA IN PROVA | 14 | 3.28 | 2.03 | 1.25 | 0.0001 | |
| OLIO DI MAIS | 17 | 3.22 | 2.66 | 0.56 | 0.01 | |

S.I.B.
M.I.

Come risulta dalla tabella 9, la sostanza in prova presenta l'effetto di abbassare il livello di trigliceridi serici particolarmente in pazienti con livelli elevati (maggiori di 2,00 mmoli/litro) prima del trattamento. Nessun effetto significativo è ottenuto con olio di mais nell'intero gruppo di volontari, mentre un effetto ridottissimo è ottenuto in persone con alti livelli di trigliceridi.

TABELLA 10

EFFETTO DELLA SOSTANZA IN PROVA E DELL'OLIO DI MAIS SULL'AGGREGAZIONE DELLE PIASTRINE DEL SANGUE

| Gruppo | n | Collagene 0,2 µg/ml | | | | Collagene 0,1 µg/ml | | | |
|-------------------|----|---------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|------|-----------|------|
| | | Prima | Dopo | Prima | Dopo | Prima | Dopo | Prima | Dopo |
| | | \bar{X} | SEM | \bar{X} | SEM | \bar{X} | SEM | \bar{X} | SEM |
| SOSTANZA IN PROVA | 21 | 63.4 ± 4.40 | 38.8 ± 5.19 | 38.0 ± 5.91 | 13.7 ± 3.77 | | | | |
| OLIO DI MAIS | 21 | 73.5 ± 4.40 | 57.4 ± 6.37 | 43.4 ± 45.5 | 15.2 ± 3.32 | | | | |

Come risulta evidente dalla tabella 10 le composizioni secondo la presente invenzione presentano effetto antiaggregante sulle piastrine sanguigne.

Il complesso fosfolipidico costituente il fattore VII di coagulazione è riscontrato nel plasma di uomini appartenenti ad un gruppo ad alto rischio per disturbi cardiovascolari, come è descritto in P. Leren et al., [The Oslo Study, Cardiovascular disease in middle aged and young Oslo men, Acta Med. Scand., suppl. 588, 1-38, (1978)] e Dalaker et

S.I.B.
M.I.

al., [A novel form of factor VII in plasma from men at risk for cardiovascular disease, Br. J. Haematol., 61, 315-322, (1985)], ed è considerato un altro fattore di rischio per disturbi cardiovascolari.

TABELLA 11

EFFETTO DELLA SOSTANZA IN PROVA E DELL'OLIO DI MAIS SULL'ATTIVITA' DEL FATTORE VII DI COAGULAZIONE A COMPLESSO FOSFOLIPIDICO (%)

| Gruppo | n | Prima | Dopo | Differenza |
|-------------------|----|-------|------|------------|
| SOSTANZA IN PROVA | 69 | 9.7 | 6.6 | 3.1 ** |
| OLIO DI MAIS | 72 | 8.5 | 8.8 | 0.3 N.S. |

** $p < 0.02$

Come risulta dalla tabella, l'attività viene ridotta in modo significativo con la composizione secondo la presente invenzione, mentre non si ottiene alcun effetto significativo con olio di mais.

Secondo i risultati mostrati nelle tabelle 3-11 sopra riportate, una composizione secondo la presente invenzione presenta una efficacia significativa su tutti i suddetti fattori di rischio per disturbi cardiovascolari. In confronto, alcuni risultati positivi sono ottenuti con olio di mais, ma nessun effetto significativo è ottenuto per la pressione sanguigna, per il livello di trigliceridi serici o per l'attività del fattore VII di coagulazione. Inoltre, gli effetti misurati nel gruppo

S.I.B.
MI

dell'olio di mais per questi fattori di rischio sembrano andare in direzione opposta, risultando dannosi.

Pertanto, le composizioni di acidi grassi secondo la presente invenzione sono potenzialmente molto utili per il trattamento e la profilassi di fattori multipli di rischio noti per i disturbi cardiovascolari, come la ipertensione, la ipertrigliceridemia e l'attività elevata del fattore VII di coagulazione a base di complesso fosfolipidico.

Le dosi della composizione della presente invenzione richieste per l'effetto terapeutico o profilattico variano con la modalità di somministrazione. Nelle prove effettuate su larga scala, furono somministrati 6 grammi della composizione in prova a persona per giorno. In generale, per la persona adulta media le dosi possono variare da 1,0 a 10 grammi, secondo il peso corporeo e la gravità della condizione da trattare.

Le composizioni secondo la presente invenzione possono inoltre essere usate come farmaco addizionale rispetto all'usuale farmaco anti-ipertensivo nel trattamento della ipertensione. Le dosi si troveranno presumibilmente nella parte più bassa dell'intervallo di dosaggio sopra citato.

S. I. B.
M.

Altre possibili indicazioni mediche per cui le composizioni secondo la presente invenzione possono essere somministrate sono la poliartrite cronica, l'artrite psoriasica, la periartrite nodosa, il lupus eritematoso disseminato (LED), la sclerodermia, il morbo di Crohn, la colite ulcerosa, la psoriasi, la dermatite atopica e la cefalea come è risultato in prove normalizzate in vivo.

Preferibilmente i composti attivi dovrebbero essere somministrati per via orale sotto forma di pillole, capsule tenere o simili. Tuttavia la somministrazione potrebbe anche aver luogo attraverso qualsiasi altra via in cui gli ingredienti attivi possono essere efficacemente assorbiti ed utilizzati, per esempio per via endovenosa, sottocutanea, rettale, vaginale o eventualmente topica.

La composizione farmaceutica può infine comprendere, oltre agli ingredienti attivi EPA e DHA come definiti, uno o più veicoli farmaceuticamente accettabili ben noti nella tecnica. Le composizioni possono anche comprendere cariche, stabilizzanti, diluenti, leganti, agenti umidificanti, tensioattivi, lubrificanti e simili, come è noto nella tecnica di formulazione delle composizioni farmaceutiche.

Possono inoltre essere usati antiossidanti,

per esempio idrossitoluene, butirrati, chinoni, tocoferolo, acido ascorbico ecc., conservanti, agenti coloranti, profumi, aromi ed altri agenti farmaceutici.

ESEMPIO DI PREPARAZIONE FARMACEUTICA

Capsule di gelatina tenera contenenti 1g per capsula

Composizione:

| | |
|------------------------|-----------------|
| Estere etilico di EPA | 525 mg/capsula |
| Estere etilico di DHA | 315 mg/capsula |
| d-alfa-Tocoferolo | 4 UI/capsula |
| Gelatina | 246 mg/capsula |
| Glicerolo | 118 mg/capsula |
| Ossido di ferro rosso | 2,27 mg/capsula |
| Ossido di ferro giallo | 2,27 mg/capsula |

Gli ingredienti attivi e gli eccipienti sono pesati ed omogeneizzati in un agitatore ad alta velocità. La miscela è quindi trattata in mulino colloidale e deaerato in un recipiente di acciaio inossidabile pronta per la incapsulazione. La miscela è versata in capsule oblunghe di gelatina tenera di dimensione 20, (peso medio 1,4 grammi) usando una macchina incapsulatrice convenzionale.

de novo

RIVENDICAZIONI

1. Composizione di acidi grassi comprendente almeno l'80% in peso di acidi grassi poliinsaturi omega-3, di cui l'acido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA) C 20:5 (tutti Z) e l'acido 4,7,10,13,16,19-docosaesaenoico (DHA) C 22:6 (tutti Z) sono presenti in quantità reciproche da 1:2 a 2:1 e costituiscono almeno il 75% in peso degli acidi grassi totali, e di cui altri acidi omega 3 C 20, C21 e C22 costituiscono almeno il 3% in peso degli acidi grassi totali, ed in cui i detti acidi possono essere eventualmente presenti sotto forma di sali o derivati farmaceuticamente accettabili.

2. Composizione secondo la rivendicazione 1, comprendente anche acido 6,9,12,15,18-eneicosapentaenoico C 21:5 (tutti Z) e/o acido 7,10,13,16,19-docosapentaenoico C 22:5 (tutti Z) e/o acido 6,9,12,15-ottadecatetraenoico C 18:4 (tutti Z).

3. Composizione secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui la concentrazione totale di acidi grassi omega-3 aventi una lunga catena di almeno C20 è di almeno 90% in peso, di cui EPA e DHA costituiscono almeno l'85% in peso degli acidi grassi totali e sono presenti in quantità rispettive di EPA:DHA da 1:1 a 2:1, e gli altri

acidi omega-3 C 20, C 21 e C 22 costituiscono almeno il 4,5% in peso.

4. Composizione secondo la rivendicazione 3, in cui il rapporto EPA:DHA è circa 3:2.

5. Composizione secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui la concentrazione totale di acidi grassi omega-3 aventi una lunga catena di almeno C 20 è di almeno 95% in peso, dove EPA e DHA costituiscono almeno il 90% in peso degli acidi grassi totali e gli altri acidi grassi omega-3 C 20, C 21 e C 22 costituiscono almeno il 4,5% in peso degli acidi grassi totali.

6. Composizione secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui la concentrazione totale di acidi grassi omega-3 aventi una lunga catena di almeno C 20 è di almeno 85% in peso, dove EPA e DHA costituiscono almeno l'80% in peso e gli altri acidi omega-3 C 20, C 21 e C 22 costituiscono almeno il 4,5% in peso degli acidi grassi totali.

7. Composizione secondo la rivendicazione 5 o 6, in cui EPA e DHA sono presenti in quantità rispettive da 1:1 a 2:1.

8. Composizione secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui gli acidi grassi sono presenti sotto forma di sali farmaceuticamente

accettabili.

9. Composizione secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui gli acidi grassi sono presenti sotto forma di derivati farmaceuticamente accettabili.

10. Composizione secondo la rivendicazione 9, in cui il derivato è un estere.

11. Composizione secondo la rivendicazione 10, in cui l'estere è un estere alchilico.

12. Composizione secondo la rivendicazione 11, in cui gli acidi grassi sono presenti sotto forma di esteri etilici.

13. Composizione secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni per il trattamento o la profilassi di fattori multipli di rischio per disturbi cardiovascolari.

14. Procedimento di produzione di una composizione di acidi grassi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-12, in cui materiale marino oleoso grezzo è sottoposto alle seguenti fasi lavorative in sequenza facoltativa: transesterificazione, concentrazione e distillazione molecolare, per cui è isolata una frazione principale contenente esteri degli acidi omega-3 C 20:5 e C 22:6 ed avente una quantità complessiva di esteri di acidi grassi poli-

insaturi omega-3 aventi una lunga catena di almeno C 20 di almeno 80% in peso, la concentrazione e la distillazione molecolare essendo effettuate in condizioni che evitano l'ossidazione e l'isomerizzazione degli acidi omega-3; e, se si desidera, idrolizzando successivamente gli esterî di acidi grassi omega-3 ad acidi grassi liberi, e, se si desidera, trasformando quindi gli acidi grassi liberi in sali farmaceuticamente accettabili.

15. Procedimento secondo la rivendicazione 14, in cui la detta fase di concentrazione è effettuata mediante frazionamento con urea.

16. Uso di una composizione contenente almeno l'80% in peso di acidi grassi omega-3, di cui l'acido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA) C 20:5 (tutti Z) e l'acido 4,7,10,13,16,19-docosaesanoico (DHA) C 22:6 (tutti Z) sono presenti in quantità relative da 1:2 a 2:1 e costituiscono almeno il 75% in peso degli acidi grassi totali, per la produzione di unpreparato farmaceutico per il trattamento o la profilassi di fattori multipli di rischio per disturbi cardiovascolari.

17. Uso secondo la rivendicazione 16, in cui la detta composizione è come definita in una qualsiasi delle rivendicazioni 1-12.

18. Procedimento di produzione di una composizione farmaceutica per il trattamento o la profilassi di fattori multipli di rischio per disturbi cardiovascolari comprendente l'incorporazione in un veicolo o diluente farmaceuticamente accettabile di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-12.

19. Composizione di acidi grassi secondo la rivendicazione 1 e sostanzialmente come sopra descritta.

20. Procedimento per la produzione di una composizione farmaceutica sostanzialmente come descritto nell'esempio.